

单克隆抗体 3F3 识别电鳗乙酰胆碱酯酶构象抗原决定簇¹

傅风华², 王玉霞², 李凤珍³, 辛颜彬³, 孙曼霁⁴

(军事医学科学院毒物药物研究所,

³微生物流行病学研究所, 北京 100850, 中国)

关键词 电鳗; 乙酰胆碱酯酶; 抗原决定簇; 单克隆抗体; 梭曼

目的: 研究天然电鳗乙酰胆碱酯酶(AChE)单克隆

抗体 3F3 针对的抗原决定簇的类型。方法: 以酶联免疫吸附试验测定抗原与抗体间的反应。结果: 单克隆抗体 3F3 能与天然 AChE 反应, 而不与还原并烷基化的 AChE (RA-AChE) 反应; 梭曼不影响 3F3 与 AChE 的结合; 化学合成的含 AChE 活性中心丝氨酸的 24 肽不与 3F3 反应。结论: 3F3 是识别电鳗 AChE 活性中心构象抗原决定簇的单克隆抗体, 但它不占据 AChE 活性中心的丝氨酸残基。

286-288

蛇床子 香豆素, 尼尔雌醇 骨代谢

285

蛇床子香豆素与尼尔雌醇对去卵巢大鼠骨代谢的影响¹

李朝阳, 吴铁², 李青南, 梁念慈, 黄连芳, 崔燎², 庄海旗³, 蔡春³, 莫丽儿³

(广东医学院 骨生物学研究室, ²药理学教研室, ³化学教研室, 湛江 524023, 中国)

R285.5

Effects of Fructus Cnidii coumarins compared with nilestriol on osteoporosis in ovariectomized rats¹

LI Chao-Yang, WU Tie², LI Qing-Nan, LIANG Nian-Ci, HUANG Lian-Fang, CUI Liao², ZHUANG Hai-Qi³, CAI Chun³, MO Li-Er³
(Bone Biology Laboratory, ²Department of Pharmacology, ³Department of Chemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

KEY WORDS *Cnidium monnieri*; coumarins; nilestriol; ovariectomy; osteoporosis; tibia

AIM: To compare the total coumarins from dried fruits of *Cnidium monnieri* (TCCM) and nilestriol (Nil) against osteoporosis. METHODS: SD rats (40, ♀, 3-month-old) were randomly divided into basal control, age control, ovariectomized (Ova), Ova + TCCM 67 mg · kg⁻¹, Ova + TCCM 200 mg · kg⁻¹, 6 times a week, and Ova + Nil 1 mg · kg⁻¹, ig once a week. After 12 wk, sections (20 μm) of proximal tibiae were examined histologically. RESULTS: Ova reduced markedly the trabecular

bone mass due to bone resorption exceeded bone formation (%Tb. Ar - 59 %). Treatment with TCCM 67 mg · kg⁻¹ partly suppressed bone turnover, but did not inhibit bone loss in Ova rats (%Tb. Ar - 43 %). Treatment with TCCM 200 mg · kg⁻¹ and Nil 1 mg · kg⁻¹ increased the trabecular area (%Tb. Ar + 100 % and + 274 %). CONCLUSION: Nil was more potent than TCCM in protecting against osteoporosis in Ova rats via supression of bone turnover.

关键词 蛇床; 香豆素类; 尼尔雌醇; 卵巢切除术; 骨质疏松症; 胫骨

目的: 评价蛇床子总香豆素(total coumarins from dried fruits of *Cnidium monnieri*, TCCM)抗骨质疏松的剂量反应, 并与尼尔雌醇(nilestriol, Nil)比较。方法: 用3月龄去卵巢SD雌性大鼠, TCCM 67 mg · kg⁻¹和200 mg · kg⁻¹ ig, 均每周6次; Nil 1 mg · kg⁻¹ ig, 每周1次, 持续12 wk。取胫骨, 不脱钙骨片测量。结果: 去卵巢大鼠骨小梁面积下降59%, 出现骨吸收大于骨形成的高转换型骨质疏松; 低剂量的TCCM仅部分抑制骨高转换, 不能阻止骨质疏松的发生(与同年龄组大鼠相比骨小

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39470367.

Received 1996-08-27

Accepted 1997-01-27

梁面积减少 43 %); 高剂量的 TCCM 和 Nil (比去卵巢组骨小梁面积分别增加 100 % 和 274 %) 一样, 完全抑制骨高转换, 能有效防止去卵巢后骨质疏松, 但 Nil 抑制骨高转换的作用较强。结论: 高剂量 TCCM 通过抑制骨转换对去卵巢大鼠有预防骨质疏松的作用, 而 Nil 作用较 TCCM 强。

伞形科植物蛇床的果实内总香豆素 (total coumarins from dried fruits of *Cnidium monnieri*, TCCM) 对去卵巢大鼠骨质疏松和类固醇性大鼠骨质疏松均有明显的预防作用^[1-3]。本实验比较 TCCM 与抗骨质疏松药尼尔雌醇 (nilestriol, Nil)^[4,5], 亦为临床防治骨质疏松提供依据。

MATERIALS AND METHODS

药物 蛇床子 (*Fructus Cnidii*) 和 TCCM 为本院化学教研室参考文献^[6,7]用丙酮提取, 得率 4.4 %。经 GC-MC 鉴定^[8], 主要含蛇床子素 (osthole), 棕榈酸 (palmitic acid), 花椒毒素 (xanthotoxin), 花椒毒酚 (xanthotoxol), 别异英波拉托林 (allosinperatorin), 欧芹属素乙 (imperatorin) 等。本项目研究采用总香豆素 (含上述各种成分) ig, 分高低两个剂量: 高剂量组为 200 g·L⁻¹, 按 200 mg·kg⁻¹, 相当于生药 5 g·kg⁻¹; 低剂量组配成 67 g·L⁻¹, 按 67 mg·kg⁻¹。尼尔雌醇: 上海第十二制药厂生产, 2 mg/片, 批号: 930201。其它药物与试剂同文献。

仪器 低速锯 (Buehler Ltd, USA), 半自动图象数字化分析仪包括光镜和荧光显微镜 (Nikon, 日本), 数字化

板, 电脑和形态学程序 "Stereology" 体视学 (KSS computer engineers, Magna UT, USA)。

SD 大鼠 大鼠对照组设基础对照组、年龄对照组、去卵巢 (Ova) 组和 Ova + Nil 治疗组, 大鼠和实验条件同文献^[9], 但同时增加两组: Ova + TCCM 低剂量治疗组 (9 鼠), Ova + TCCM 高剂量治疗组 (6 鼠)。

骨片测量 实验 12 wk 后, 制骨片和测量各参数^[1,2]。

统计学处理 各参数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。显著性用组间 *t* 检验。

RESULTS

体重 实验结束时, Nil 能抑制去卵巢大鼠体重的增加, TCCM 低剂量组 (306 ± 17 g) 与 TCCM 高剂量组 (299 ± 30 g) 都不抑制去卵巢大鼠体重的增加, 这与蛇床子素治疗组结果^[9]一致。

骨组织形态结构 去卵巢大鼠骨形成和骨吸收均明显增加, 出现骨高转换, 导致骨质疏松, Nil 能强烈抑制骨高转换 (骨形成与骨吸收参数值在年龄组水平以下), 明显预防去卵巢大鼠的骨丢失; 蛇床子素亦能抑制骨高转换, 有效预防去卵巢大鼠骨质疏松, 但反映骨量的参数骨小梁面积百分率比年龄组有所下降 (%Tb.Ar - 31 %)^[9]。

TCCM 低剂量能明显降低去卵巢大鼠的骨形成, 骨吸收有所下降, 骨量有增加趋势, 但仍达不到正常组水平。TCCM 高剂量能明显降低去卵巢大鼠的骨形成和骨吸收, 骨转换的参数和骨量基本维持在年龄组水平 (Tab 1)。

Tab 1. Histomorphometric indices in proximal tibial metaphysis. ($\bar{x} \pm s$). **P* > 0.05, ^b*P* < 0.05, ^c*P* < 0.01 vs age control; ^d*P* > 0.05, ^e*P* < 0.05, ^f*P* < 0.01 vs Ova control; ^g*P* > 0.05, ^h*P* < 0.05, ⁱ*P* < 0.01 vs Ova + Nil.

	Ova + TCCM 67 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹			Ova + TCCM 200 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹			
	$\bar{x} \pm s$ (n=9)	% - a	% - o	$\bar{x} \pm s$ (n=6)	% - a	% - o	% - n
%Tb.Ar	11 ± 4	-43 ^c	+38 ^d	16 ± 3	-18 ^a	+100 ^f	-47 ^g
Tb.Th	49 ± 4	-7 ^a	+7 ^d	54 ± 8	+0 ^a	+16 ^d	-6 ^g
Tb.N	2.2 ± 0.7	-40 ^c	+28 ^d	3.1 ± 0.9	-17 ^a	+77 ^f	-39 ^h
Tb.Sp	434 ± 144	+88 ^c	-27 ^d	294 ± 90	+27 ^a	-50 ^c	+77 ^h
%L.Pm	8 ± 3	-3 ^a	-39 ^f	9 ± 4	+10 ^a	-31 ^d	+139 ^h
BFR/BV	191 ± 84	+7 ^a	-48 ^f	198 ± 82	+12 ^a	-46 ^c	+175 ⁱ
BFR/BS	15 ± 6	-4 ^a	-44 ^f	18 ± 8	+13 ^a	-35 ^d	+169 ^h
%O.Pm	4.4 ± 1.9	+60 ^a	-44 ^e	3.9 ± 3.2	+40 ^a	-51 ^e	+490 ^h
%Er.Pm	3.2 ± 1.5	+79 ^a	-30 ^d	1.6 ± 0.5	-13 ^a	-66 ^f	+118 ^g
Ritio	3.0 ± 1.5	-43 ^h	-3 ^d	6.1 ± 2.6	+17 ^a	+99 ^e	-3 ^g

Ova: ovariectomized; % - a: compared with age control; % - o: compared with Ova; % - n: compared with nilestriol treatment group. The data of age control, Ova and nilestriol treatment group, please see reference [9].

TCCM 高剂量与 Nil 比较, 前者的骨形成和骨吸收的参数值较高, Tb.N 有所减少, %Tb.Ar 有所下降, 但无显著性意义, 说明两个治疗组大鼠骨量无显著性差异。

DISCUSSION

本实验 TCCM 低剂量对去卵巢大鼠的骨形成和骨吸收都有不同程度的抑制, 但骨吸收仍占主导, 骨质仍有部分丢失, 骨量低于年龄组。故 TCCM 低剂量仅部分抑制去卵巢后的骨高转换, 不能阻止骨质疏松的发生。TCCM 高剂量则能完全抑制去卵巢诱导的骨高转换, 并以抑制骨吸收为主, 各参数值基本在年龄组水平, 从而能维持骨代谢过程的正平衡, 有效地防止了去卵巢大鼠的骨丢失。

蛇床子素是 TCCM 众多成分中的一种, 其纯品结晶能有效地抑制去卵巢大鼠骨高转换、防止骨质疏松的发生, 但治疗组的骨量仍比年龄组有所减少(%Tb.Ar - 31%)^[9], 而 TCCM 高剂量治疗组的骨转换和骨量参数值更接近年龄组水平, 表示 TCCM 高剂量能更好地维持去卵巢大鼠的骨代谢, 故 TCCM 高剂量(多种成分)比蛇床子素(单一成分)预防去卵巢大鼠骨质疏松的效果更令人满意。

Nil 能有效地预防去卵巢大鼠骨质疏松, 其作用机制是抑制骨高转换, 但由于其过度抑制骨转换, 使去卵巢大鼠的骨形成和骨吸收的参数值降在年龄组水平以下^[9], 即骨骼处于一种相对“静止”的状态, 从而影响了骨骼本身的新陈代谢功能。根据“Resorption-Formation Coupling”理论, 在骨重建过程中, 骨形成与骨吸收相偶联, 强烈抑制骨转化将有可能影响骨微损伤的修复和增加骨的脆性^[10]。雌激素长期使用可引起癌肿等副作用, 而中草药毒副作用小, 且 TCCM 高剂量能在接近生理状态下维持去卵巢大鼠正常的骨转化

与骨量。故在维持骨的正常代谢方面, TCCM 高剂量比 Nil 更符合生理, 具有更大的优越性。

综上所述, TCCM 对去卵巢大鼠骨质疏松的预防作用, 与实验所用的剂量有关, 低剂量仅部分抑制骨高转换, 不能防止骨质疏松的发生; 高剂量则可完全抑制去卵巢后的骨高转换, 保持骨量在正常水平。Nil 强烈地抑制骨转换, 而 TCCM 高剂量即能维持正常的骨代谢。

REFERENCES

- 1 Li QN, Liang NC, Wu T, Wu Y, Xie H, Huang GD, *et al.* Effects of total coumarins of Fructus Cnidii on skeleton of ovariectomized rats. Proceedings of the First International Symposium on Osteoporosis and Metabolic Bone Disease [ISO'92], 1992 May 8-11, Beijing, China, 187-92
- 2 Li QN, Liang NC, Wu T, Wu Y, Xie H, Huang GD, *et al.* Effects of total coumarins of Fructus Cnidii on skeleton of ovariectomized rats. Acta Pharmacol Sin 1994; 15: 528-32.
- 3 Xie H, Li QN, Huang LF, Wu T. Effect of total coumarins from dried fruits of *Cnidium monnieri* on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. Acta Pharmacol Sin 1994; 15: 371-4
- 4 Cao ZS, Lu Y, Ye CQ, Yuan LZ, Ma LF, Tu KC, *et al.* Nilestrol used to prevent and cure the osteoporosis: a morphometrical study. J Gerontol 1992; 12: 99-101.
- 5 Cheng GJ, Liu JL, Ye HF, Zhang Q, Wan ZC. Preliminary study of nilestrol on preventing bone loss in postmenopausal women. In: Liu ZH, editor. Osteoporosis. 1st ed. Beijing: Chemical Industry Publ, 1992; 285-90.
- 6 Xiang RD, Fu XH. Studies on the chemical constituents of common cnidium (*Cnidium monnieri*) (I). Chin Trad Herb Drugs 1984; 15: 14-5.
- 7 Xiang RD, Wang D, Fu XH. Studies on the chemical constituents of common cnidium (*Cnidium monnieri*) (II). Chin Trad Herb Drugs 1986; 17: 6-7.
- 8 Cheng DD, Lei Y, Zhao J. TLC-spectrophotometric determination of osthol and total linearfuranocoumarin in *Shechuangzi*. Chin Pharm J 1990; 25: 164-6.
- 9 Li CY, Wu T, Li QN, Lin BY, Liang NC, Huang LF, *et al.* Quantitative study on the effect of osthole on proximal tibiae in ovariectomized rats. Acta Pharm Sin 1996; 31: 327-32.
- 10 Li QN, WSS Jee, Ma YF, Ke HZ, Xie H, Huang LF, *et al.* Risedronate pretreatment does not hamper the anabolic effects of prostaglandin E₂ in OVX rats. Bone 1995; 17: 261-6.